

***Mycoplasma*-suvun bakteerien merkitys koiran hengitystiesairauksissa**

Eläinlääketieteen lisensiaatin tutkielma

Krista Laaksonen

Pieneläinten sisätautioppi

Kliinisen hevos- ja pieneläinlääketieteen osasto

Eläinlääketieteellinen tiedekunta

Helsingin yliopisto

2018



Tiedekunta - Fakultet - Faculty		Osasto - Avdelning - Department	
Eläinlääketieteellinen tiedekunta		Kliinisen hevos- ja pieneläinlääketieteen osasto	
Tekijä - Författare - Author			
Krista Laaksonen			
Työn nimi - Arbetets titel - Title			
Mycoplasma-suvun bakteerien merkitys koiran hengitystiesairauksissa			
Oppiaine - Läroämne - Subject			
Pieneläinten sisätautioppi			
Työn laji - Arbetets art - Level	Aika - Datum - Month and year	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages	
Lisensiaatin tutkielma	3/2018	35	
Tiivistelmä - Referat - Abstract			
<p><i>Mycoplasma</i>-suvun bakteerit ovat pienimpiä prokaryootisia mikro-organismeja, joiden tiedetään aiheuttavan erilaisia klinisiä sairauksia eri eläinlajeissa. Tutkimustietoa <i>Mycoplasma</i>-suvun bakteerien merkityksestä koirien hengitystiesairauksissa on kuitenkin rajallinen määrä ja tämän kirjallisuuskatsauksen tarkoituksena on koota olemassa oleva, aiheeseen liittyvä tieto yhteen ja pohtia tulosten kliinistä merkitystä eläinlääkärin päivittäisessä työssä.</p> <p>Koirilla on ylähengitysteissä moninainen mikrobisto ja nykytietämyksen mukaan <i>Mycoplasma</i>-suvun bakteerit kuuluvat osaksi koiran ylähengitysteiden normaaliflooraa. Yleisesti on todettu, että myöskään koiran alahengitystiet eivät ole aina steriilit, mutta mycoplasmojen esiintyvyydestä terveen koiran alahengitysteissä on saatu ristiriitaisia tuloksia. Osassa tutkimuksista terveiden koirien alahengitystienäytteistä on eristetty mycoplasmoja, osassa puolestaan ei. Näiden tutkimusten perusteella näyttäisi kuitenkin siltä, että ainakin osalla koirista mycoplasmat voivat kuulua myös alahengitysteiden normaaliflooraan.</p> <p><i>Mycoplasma</i>-prevalenssit canine infectious respiratory disease -sairaudessa eli kennelyksässä vaihtelevat muutamasta prosentista jopa 81 %:iin, tutkimuksesta ja tutkimusmenetelmästä riippuen. Vaikka kennelyksäoireilevien koirien hengitysteistä on löydetty useita eri <i>Mycoplasma</i>-lajeja, ainut sairauteen liitetty laji on <i>Mycoplasma cynos</i>. Lisäksi mycoplasmoilla on epäilty olevan yhteyttä kroonisiin hengitystieinfektioihin ja sen seurauksena aiheuttaneen esimerkiksi hengitysteiden kollapseja. Tutkimustietoa aiheesta on kuitenkin hyvin niukasti. Mycoplasmat on yhdistetty myös koirien pneumonioihin eli keuhkotulehduksiin, joissa mycoplasmat ovat useimmiten osana sekainfektioita. Kuitenkin viitteitä mycoplasmojen kyvystä toimia ainoana taudinaiheuttajana on myös saatu, erityisesti pienillä pennuilla, joita on jopa menehtynyt mycoplasmojen aiheuttamiin pneumonioihin.</p> <p>Nykyisessä mikrobilääkeresistenssilanteessa potilaiden mikrobilääkehoito tulisi aina perustua bakteeriviljelyihin ja herkkyysmäärittäisiin. Mycoplasmojen osalta viljely ei kuitenkaan tuo tietoa yksittäisen potilaan hoitoon, koska mycoplasmat vaativat erityiset viljelyolosuhteet ja viljely kestää noin kaksi viikkoa. Koska potilaan hoitopäätös ei voi odottaa niin kauan, ratkaisun ongelmaan voisi tuoda kvantitatiivinen real-time-PCR-tutkimus. Menetelmällä saadaan muutamissa tunneissa selvitettyä näytteestä löytyneiden taudinaiheuttajien määriä, jolloin voidaan mahdollisesti arvioida, että mitä enemmän näytteestä löytyy jotain tiettyä taudinaiheuttajaa, sitä todennäköisemmin sillä on ollut osuutta taudinaiheutuksessa. Tällöin voi tuloksesta saada tukea mikrobilääkkeen valintaan myös ilman viljelyä. Mycoplasmojen kohdalla mikrobilääkkeen valintaan oman haasteensa tuo se, että soluseinättöminä bakteereina mycoplasmat ovat resistenttejä yleisesti käytetyille beetalaktaami-antibioteille. Lisäksi mycoplasmoihin tehoavat mikrobilääkkeet, esimerkiksi enrofloxasiini, eivät kuulu ensisijaisesti hengitystieinfektioissa käytettäviin mikrobilääkkeisiin.</p> <p>On kuitenkin huomiotava, että tutkimuksia kannattaa silti tehdä, sillä yksittäisen koiran <i>Mycoplasma</i>-löydöksestä voi olla hyötyä erityisesti kenneleissä, joissa on pentuja riskissä saada tartunta. Tällöin jos sairastumisia tapahtuu, osataan huomioida mycoplasmojen mahdollisuus sekä valita niihin tehoava mikrobilääke, ja siten jopa pelastaa koiranpentujen henki.</p>			
Avainsanat - Nyckelord - Keywords			
<i>Mycoplasma</i> spp., <i>Mycoplasma cynos</i> , koira, hengitystiesairaus, canine infectious respiratory disease, pneumonia			
Säilytyspaikka - Förvaringställe - Where deposited			
HELDA – Helsingin yliopiston digitaalinen arkisto			
Työn johtaja (tiedekunnan professori tai dosentti) ja ohjaaja(t) - Instruktor och ledare - Director and Supervisor(s)			
Työn johtaja: pieneläinsisätautiopin dosentti, ELT, pieneläinsairauksien erikoiseläinlääkäri Minna Rajamäki Työn ohjaaja: ELT, pieneläinsairauksien erikoiseläinlääkäri Sanna Viitanen			

SISÄLLYS

1 JOHDANTO.....	1
2 KIRJALLISUUSKATSAUS	2
2.1 <i>Mycoplasma</i> -suvun bakteerit	2
2.1.1 Yleistä.....	2
2.1.2 Taudinaiheutusmekanismit	2
2.1.3 Mycoplasmojen aiheuttamia tauteja eläimissä.....	3
2.2 <i>Mycoplasma</i> -suvun bakteerien diagnosointi hengitysteistä	5
2.2.1 Bakteeriviljely.....	5
2.2.2 Polymeraasiketjureaktio.....	6
2.2.3 Näytteenottotekniikat.....	8
2.2.3.1 Ylähengitystiet.....	8
2.2.3.2 Alahengitystiet.....	9
2.3 Terveen koiran hengitysteiden anatomia ja mikrobisto.....	12
2.3.1 Ylähengitystiet.....	12
2.3.2 Alahengitystiet	14
2.4 Mycoplasmojen rooli hengitystiesairauksissa.....	16
2.4.1 <i>Mycoplasma</i> spp. ja canine infectious respiratory disease	17
2.4.2 Mycoplasmojen osuus kroonisissa hengitystiesairauksissa	20
2.4.2.1 Krooninen riniitti	20
2.4.2.2 Krooninen yskä	20
2.4.3 Mycoplasmojen osuus bakteeriperäisen pneumonian aiheuttajana	22
2.5 <i>Mycoplasma</i> -infektoiden hoito.....	25
3 POHDINTA.....	27
LÄHDELUETTELO	31

1 JOHDANTO

Mycoplasma-suvun bakteerit ovat pienimpiä prokaryoottisia mikro-organismeja (Razin ja Tully 1995, Quinn ym. 2011), joiden tiedetään aiheuttavan monia erilaisia klinisiä sairauksia eri eläinlajeissa (Quinn ym. 2011). Tutkimustietoa *Mycoplasma*-suvun bakteerien merkityksestä koirien hengitystiesairauksien yhteydessä on kuitenkin rajallinen määrä ja tämän kirjallisuuskatsauksen tarkoituksena on koota tutkimustieto yhteen sekä pohtia tulosten klinistä merkitystä eläinlääkärin päivittäisessä työssä.

Kirjallisuuskatsauksessa käsitellään koiran hengitysteiden normaalimikrobistoa ja mycoplasmojen osuutta terveillä koirilla sekä mycoplasmojen osuutta canine infectious respiratory disease (CIRD) -sairaudessa eli kennelyksässä, kroonisissa hengitystiesairauksissa ja keuhkotulehduksissa eli pneumonioissa.

Lisäksi pohditaan eri diagnosointimenetelmien hyötyjä, haittoja ja merkitystä sekä tutkimusten, että eläinlääkärin päivittäisen työskentelyn näkökulmasta. Myös *Mycoplasma*-infektioiden hoitovaihtoehtoja käsitellään lyhyesti, sillä mycoplasmoilla on erityispiirteinä niiden kykenemättömyys tuottaa soluseinän peptidoglykaania tai sen esiasteita (Quinn ym. 2011), joten niillä ei ole lainkaan soluseinää (Bemis 1992, Razin ja Tully 1995, Quinn ym. 2011). Soluseinättömyyden vuoksi ne ovat luontaisesti resistenttejä antibiooteille, joiden toimintamekanismi perustuu bakteerin soluseinäsynteesin vaurioittamiseen (Quinn ym. 2011), kuten esimerkiksi yleisesti käytetyille beetalaktaameille (Bemis 1992).

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 *Mycoplasma*-suvun bakteerit

2.1.1 Yleistä

Mycoplasma-suvun bakteerit ovat pienimpiä prokaryoottisia mikro-organismeja (Razin ja Tully 1995, Quinn ym. 2011) ja niiden koko vaihtelee 0,3-0,8 µm:n välillä (Razin ja Tully 1995). Mycoplasmat kuuluvat taksonomisesti *Mollicutes*-luokkaan (Razin ja Tully 1995, Quinn ym. 2011). Mycoplasmoilla on melko pieni, noin 800 geeniä sisältävä genomi, joten niiltä puuttuu moniin metabolisiin prosesseihin vaadittavat geenit (Quinn ym. 2011). Tämän seurauksena mycoplasmat vaativat kasvu ympäristöltään runsaasti ravinteita (Chalker 2004, Quinn ym. 2011), eivätkä ne jakaudu isäntäelion ulkopuolella, vaikka selviytyvätkin lyhyitä aikoja ympäristössä. Mycoplasmat eivät myöskään kykene tuottamaan soluseinän peptidoglykaania tai sen esiasteita (Quinn ym. 2011), joten niillä ei ole lainkaan soluseinää (Bemis 1992, Razin ja Tully 1995, Quinn ym. 2011). Soluseinättömyyden vuoksi ne ovat resistenttejä antibiooteille, joiden toimintamekanismi perustuu bakteerin soluseinäsynteesin vaurioittamiseen (Quinn ym. 2011), kuten esimerkiksi beetalaktaameille (Bemis 1992). Mycoplasmat ovat kuitenkin herkkiä kuumuudelle, kuivumiselle sekä pesu- ja desinfiointiaineille (Quinn ym. 2011). Useimmat mycoplasmat ovat fakultatiivisesti anaerobeja, mutta myös obligatorisia anaerobisia lajeja on löydetty lampaiden ja nautojen pötsistä (Razin ja Tully 1995, Quinn ym. 2011).

2.1.2 Taudinaiheutusmekanismit

Mycoplasmat eivät tuota spesifejä toksineja (Razin ja Tully 1995, Quinn ym. 2011) tai invasiineja (Quinn ym. 2011), mutta ne kiinnittyvät kohdesoluihinsa isäntäeläimessä

(Razin ja Tully 1995, Quinn ym. 2011). Kiinnittyminen onkin tärkein yksittäinen mycoplasmojen patogeenisuuteen vaikuttava ominaisuus (Quinn ym. 2011) ja on edellytys mycoplasmojen kolonisaatiolle ja infektion aiheuttamiselle (Razin ja Tully 1995). Kiinnittyessään patogeeniset mycoplasmat aiheuttavat isäntäeläimessä tulehdusreaktion, olemalla mitogeenisiä pääosin B- (Razin ja Tully 1995, Quinn ym. 2011), mutta myös T-lymfosyyteille (Quinn ym. 2011). Tämä tulehdussolujen aktivaatio aiheuttaa proinflammatoristen sytokiinien vapautumisen ja sitä kautta tulehdusreaktion (Razin ja Tully 1995, Quinn ym. 2011). Mycoplasmat kykenevät kiinnittymään myös neutrofiileihin ja makrofageihin sekä heikentämään niiden fagosytoottisia toimintoja (Quinn ym. 2011). Vaikka mycoplasmat eivät tuota toksineja, ne voivat tuottaa vetyperoksidia (H_2O_2) (Razin ja Tully 1995, Quinn ym. 2011), joka aiheuttaa toksisia vaurioita kohdesoluun, johon ne kiinnittyvät (Quinn ym. 2011). Mycoplasmat eivät tavallisesti tunkeudu kudoksiin (Razin ja Tully 1995), mutta hyvin alhainen tai hyvin korkea ikä, stressi ja samanaikainen muu infektio voivat altistaa mycoplasmojen kudosisnvaasiolle (Quinn ym. 2011). Immuunipuutteisilla ihmisillä onkin todettu mycoplasmojen kudosisnvaasiota (Razin ja Tully 1995).

Mycoplasmojen erittäin tärkeä virulenssitekijä on niiden solukalvon pintaproteiinit, joita on paljon erilaisia. Niiden avulla bakteerit kykenevät adaptoitumaan nopeasti ympäristöönsä ja välttelemään isäntäeläimen immuunipuolustusta (Razin ja Tully 1995, Quinn ym. 2011). Ei kuitenkaan ole tiedossa kuinka näiden pintaproteiinien antigeenejä säädelään (Quinn ym. 2011). Quinn ym. (2011) pohtivat, että kyseessä voi olla joko säädelty tapahtuma tai satunnainen, ympäristön aiheuttamasta valintapaineesta johtuva muuntelu (Quinn ym. 2011).

2.1.3 Mycoplasmojen aiheuttamia tauteja eläimissä

Mycoplasma-suvun bakteerit aiheuttavat monia erilaisia klinisiä sairauksia eri eläinlajeissa, joita on esitetty taulukossa 1 (Quinn ym. 2011). Mycoplasmoja on löydetty mm. sekä ihmisten, että eläinten konjunktivalta, nenäontelosta, oropharynxistä, suolistosta, ja genitaaleista (Razin ja Tully 1995, Quinn ym. 2011).

Taulukko 1. *Mycoplasma*-suvun patogeenisia bakteereja ja esimerkkejä niiden aiheuttamista kliinisistä sairauksista muissa eläimissä kuin koirissa.

Isäntäeläin	Patogeeni	Kliininen sairaus
Kissa	<i>M. felis</i>	Konjunktiviitti
	<i>M. gateae</i>	Artriitti, tenosynoviitti
	<i>M. haemofelis</i>	Anemia
	<i>M. haemominutum</i>	Anemia
Nauta	<i>M. bovis</i>	Pneumonia, mastiitti, polyartriitti
	<i>M. alkalescens</i>	Mastiitti
	<i>M. bovigenitalium</i>	Lisäsukurauhastulehdus, vaginiitti, mastiitti
	<i>M. bovirhinis</i>	Mastiitti
	<i>M. bovoculi</i>	Keratokonjunktiviitti
	<i>M. californicum</i>	Mastiitti
	<i>M. canadense</i>	Mastiitti
	<i>M. dispar</i>	Pneumonia vasikoilla
	<i>M. leachii</i>	Mastiitti, polyartriitti, pneumonia
	<i>M. wenyonii</i>	Lievä anemia
Lammas, vuohi	<i>M. conjunctivae</i>	Keratokonjunktiviitti
	<i>M. ovipneumoniae</i>	Pneumonia
	<i>M. ovis</i>	Hemolyyttinen anemia
Vuohi	<i>M. putrefaciens</i>	Mastiitti, artriitti
Hevonen	<i>M. felis</i>	Pleuriitti
	<i>M. equigenitalium</i>	Abortti
Sika	<i>M. suis</i>	Lievä anemia, huono kasvu
Kalkkuna	<i>M. iowae</i>	Alkiokuolleisuus

2.2 *Mycoplasma*-suvun bakteerien diagnosointi hengitysteistä

2.2.1 Bakteriviljely

Mycoplasmat vaativat kasvaakseen erityisen kasvualustan (Bemis 1992). Randolph ym. (1993) ja Chvala ym. (2007) käyttivät tutkimuksessaan Hayflick-agaria mycoplasmojen kasvatukseen (Randolph ym. 1993, Chvala ym. 2007) ja Williams ym. (2006) puolestaan käyttivät MYCOTRIM-agaria, joka on sterolirikas agar mycoplasmojen viljelyä varten (Williams ym. 2006). Mycoplasmat vaativatkin kasvaakseen kolesterolia (Quinn ym. 2011). Viljelyissä käytetään kiinteää agaria, puolikiinteää agaria (Rosendal 1973) ja nestemäistä kasvatusalustaa (Chalker ym. 2004). Suuri bakteerimäärä tutkittavassa näytteessä hankaloittaa mycoplasmojen eristystä, joten muiden bakteerien määrän rajoittaminen helpottaa mycoplasmojen viljelyä (Chalker ym. 2004). Viljelymaljoihin onkin usein lisätty myös bentsyylipenisilliiniä tai bentsyylipenisilliinatriumia (Rosendal 1973, Johnson ym. 2013), jotka eivät beetalaktaameina rajoita mycoplasmojen kasvua (Bemis 1992), mutta rajoittavat muita kilpailevia bakteereita (Rosendal 1982).

Viljelyolosuhteina käytetään useimmiten +35 - +37 °C ja 5-10 % hiilidioksidia sisältävää ilmaa (Rosendal 1978, Randolph ym. 1993, Chandler ja Lappin 2002). Chalker ym. (2004) käyttivät viljelyssään kaasuseosta, jossa oli 95 % typpeä ja 5 % hiilidioksidia (Chalker ym. 2004). Inkubaatioajat vaihtelevat tutkimuksien mukaan: Rosendal (1973) inkuboi maljoja 4 päivää ja mikäli maljoilla ei näkynyt bakteerikasvua, inkubointia jatkettiin vielä toiset 4 päivää (Rosendal 1973). Chalker ym. (2004) puolestaan inkuboivat liemiviljelmiä vähintään 7 vuorokauden ajan ja kiinteälle agarille tehtyjä viljelyjä 28 vuorokauden ajan. Viljelyt kuitenkin tarkastettiin päivittäin ensimmäisen viikon ajan ja sen jälkeen kerran viikossa (Chalker ym. 2004). Myös Williams ym. (2006) inkuboivat maljoja 7 päivää. Quinn ym. (2011) ohjeistavat inkuboimaan viljelmiä 14 vuorokauden ajan.

Mycoplasma-suvun bakteerit erotetaan muista bakteereista mm. pesäkemorfologian ja biokemiallisten ominaisuuksien, esimerkiksi ureaasi-entsyymien tuoton, perusteella. Värjäämättömät *Mycoplasma*-pesäkkeet ovat 0,1-0,6 mm halkaisijaltaan (Quinn ym. 2011) ja näyttävät mikroskoopilla ns. paistetulta kananmunalta (engl. fried egg) (Chalker 2005, Quinn ym. 2011). Eri *Mycoplasma*-lajeja ei voida erottaa toisistaan vain pesäkemorfologian perusteella, sillä monet lajit muistuttavat toisiaan (Chalker 2005), mutta lajien erotteluun voidaan käyttää vasta-aineisiin perustuvia testejä (Bemis 1992, Chalker 2005). Testien tekemistä hankaloittaa kuitenkin se, että joskus tapahtuu ristireagointia vasta-aineisiin eri lajien välillä. Lisäksi useissa laboratorioissa ei ole antiseerumia suoraan saatavilla (Chalker 2005). Antiseerumipuutteen ja erityiskasvatusalustavaatimusten vuoksi mycoplasmaviljelyitä ei tehdä rutiinisti useimmissa laboratorioissa (Chalker 2005).

2.2.2 Polymeraasiketjureaktio

Polymeraasiketjureaktiossa eli PCR:ssä monistetaan näytteessä olevan DNA:n (tai RNA:n) määrä monikertaiseksi (MacLachlan ja Dubovi 2011, Quinn ym. 2011), jolloin sen emäsjärjestyksen selvittäminen mahdollistuu (Quinn ym. 2011). PCR:n ensimmäisessä vaiheessa puhdistettua DNA-näytettä kuumennetaan siten, että DNA denaturoituu ja kaksoisjuoste avautuu. Kuumennuksen jälkeen näytettä jäähdytetään, jolloin näytteen sekaan lisätyt, emäsjärjestykseltään tunnetut DNA-alukkeet kiinnittyvät avautuneisiin DNA-juosteisiin. Tämän jälkeen näytettä lämmitetään uudelleen, jolloin polymeraasi-entsyymi aktivoituu ja alkaa lisätä DNA-juosteisiin emäksiä, jolloin alkuperäisille DNA-juosteelle syntyy vastinjuosteet ja DNA:t ovat jälleen kaksijuosteisia. Tuloksena on kaksi kaksijuosteista DNA:ta. Reaktioketjua toistetaan useita kertoja ja monistetun DNA:n määrä kasvaa eksponentiaalisesti (MacLachlan ja Dubovi 2011, Quinn ym. 2011). Löytyneen taudinaiheuttajan tunnistukseen voidaan puolestaan käyttää useita eri menetelmiä (Quinn ym. 2011).

On olemassa myös kvantitatiivinen real-time-PCR -tekniikka (qPCR), jossa perinteisen DNA:n monistuksen lisäksi käytetään hyödyksi DNA:n aiheuttamaa fluoresenssiä

(MacLachlan ja Dubovi 2011, Quinn ym. 2011). Mitatun fluoresenssin määrä/intensiteetti kasvaa, kun monistetun DNA:n määrä kasvaa. Eli mitä enemmän fluoresenssia mitataan, sitä enemmän näytteessä on ollut kyseistä DNA:n osaa. Tällöin on mahdollista verrata löytyneiden eri DNA-näytteiden suhteellisia määriä tutkitussa näytteessä. Lisäksi saaduista DNA-määristä voidaan logaritmilaskennalla määrittää bakteerisolujen määriä tutkitussa näytteessä (Quinn ym. 2011).

PCR-tekniikan suuri hyöty on siinä, että potilasnäytteistä saadaan tunnistettua eri taudinaiheuttajia muutamissa tunneissa, kun taas *Mycoplasma*-bakteeriviljelyt ovat aikaa vieviä ja vaativia (Chalker 2005). Lisäksi ei tarvita erillisiä viljelymaljoja tai spesifisiä antiseerumeita lajitunnistusta varten (Chalker 2005). PCR-tekniikalla saadaan tutkittua myös heikosti säilöttyjä potilasnäytteitä (Quinn ym. 2011). On kuitenkin todettu, että viljelyssä *Mycoplasma*-positiiviseksi todetuista keuhkonäytteistä noin 20 % on ollut negatiivisia PCR:ssä (Chalker 2005). Toisaalta on todettu myös niin päin, että viljelyssä negatiiviseksi todettuja näytteitä on todettu positiiviseksi PCR:ssä (Chalker 2005, Chan ym. 2013, Viitanen ym. 2015). On pohdittu tuloksien voivan johtua siitä, että mycoplasmat eivät vain ole jostain syystä kasvaneet (virhenegatiivinen tulos), sillä mycoplasmat vaativat erityisiä viljelytekniikoita (Chalker 2005, Viitanen ym. 2015). On kuitenkin muistettava, että perinteinen PCR-tekniikka monistaa sekä elävien, että kuolleiden solujen DNA:ta, jolloin PCR-positiivinen tulos ei kerro bakteerisolujen elävyydestä ja siten taudinaiheutuskyvystä sillä hetkellä (Quinn ym. 2011). Viitanen ym. (2015) olivat pohtineet, että kvantitatiivisella real-time-PCR -menetelmällä puolestaan voisi olla mahdollista arvioida bakteerien kliinistä merkitystä (Viitanen ym. 2015), koska tällä menetelmällä on mahdollista tutkia näytteessä olevan DNA:n ja sitä kautta bakteerisolujen määrää (Quinn ym. 2011). Voisi siis olla mahdollista arvioida, että mitä enemmän bakteerisoluja näytteestä löytyy, sitä todennäköisimmin kyseisillä bakteereilla on ollut merkitystä taudinaiheutuksessa.

2.2.3 Näytteenottotekniikat

2.2.3.1 Ylähengitystiet

Hereillä olevalta potilaalta voidaan ottaa näytteitä nenäontelosta steriilillä näytteenottopuikolla (engl. nasal swab) sytologisia ja mikrobiologisia tutkimuksia varten (Hawkins 2009). Tutkimuksessaan Tress ym. (2017) ottivat koirien nenäontelosta näytteitä siten, että steriili näytteenottopuikko työnnettiin koiran sieraimen ja puikkoa pyöritettiin siellä huolellisesti. Näytteitä kerättiin molemmista sieraimista (Tress ym. 2017). Nenäontelon sairauksissa on mahdollista tehdä myös yleisanestesiasa nenäontelon tähystystutkimus, jonka yhteydessä on mahdollista ottaa näytteitä sytologisia, mikrobiologisia tai histopatologisia tutkimuksia varten. Tähystystutkimuksen suuri hyöty on nenäontelon, nenänielun ja suun visualisointi näytteenoton lisäksi (Hawkins 2009). Nenäontelosta on mahdollista ottaa myös huuhtelunäytteitä ilman tähystystä. Näytteenotto vaatii kuitenkin myös yleisanestesian. Näytteenotossa nenäontelon kaudaaliosiin asetetaan pehmeä katetri suun kautta osoittamaan kohti kirsua. Potilaan ollessa rinnanpäällä, käännetään kuono kohti lattiaa ja huuhdellaan nenäonteloa noin 100 ml:lla steriiliä keittosuolaliuosta ja kerätään näyte talteen jatkotutkimuksia varten (Hawkins 2009).

Mikäli potilaalla epäillään nielun tai kurkunpään sairautta, nielun tähystys on tärkeää anatomisten, toiminnallisten tai tulehduksellisten ongelmien arvioinnissa (Hawkins 2009). Toimenpide vaatii kuitenkin yleisanestesian (Creevy 2009, Hawkins 2009) ja nielun tai kurkunpään toiminnanhäiriöistä kärsivien potilaiden nukutus vaatii erityistä tarkkaavaisuutta, sillä potilaan hengitystiet eivät välttämättä nukutettuna pysy täysin auki (Hawkins 2009). Lisäksi nukutus vaikuttaa kurkunpään normaalitoimintaan, jolloin sen arviointi voi olla haastavaa (Creevy 2009). Nukutuksen aikana on mahdollista ottaa myös erilaisia näytteitä nielusta ja kurkunpäästä (Hawkins 2009), esimerkiksi pyyhkimällä näytteenottopuikolla nielua (engl. pharyngeal swab) (Randolph ym. 1993) tai kurkunpäästä (engl. laryngeal swabs) (Rosendal 1973).

2.2.3.2 Alahengitystiet

Endoskopia on yleisesti käytetty menetelmä ylä- ja alahengitysteiden tutkimuksessa ja näytteenotossa (Creevy 2009). Endoskopia vaatii kuitenkin aina yleisanestesian (Creevy 2009, Finke 2013). Endoskoopin avulla nähdään hengitysteiden mahdolliset epänormaaliudet (mm. trakeakollapsi, tulehduseritteet, hyperemia, vierasesineet) (Finke 2013) ja voidaan ottaa huuhtelunäytteitä keuhkoputkista ja alveoleista (engl. bronchoalveolar lavagage, BAL) (Creevy 2009). Näytettä otettaessa ruiskutetaan steriiliä keittosuolaliuosta hengitysteihin ja imetään ruiskulla välittömästi takaisin (Finke 2013). Käytetty nestemäärä vaihtelee: Finke (2013) suosittelee 15-25 ml:aa, jota myös Hawkins ym. (2006) käyttivät tutkimuksessaan. Johnson ym. (2013) ja Zhu ym. (2015) puolestaan käyttivät 5-20 ml:aa potilaan koosta riippuen (Johnson ym. 2013, Zhu ym. 2015). Melamies ym. (2011) suosittelevat nestemäärää, joka on laskettu potilaan painon mukaan (ml/kg). Heidän tutkimuksensa perusteella tulokset ovat yhdenmukaisemmat eri potilaiden välillä, mikäli on käytetty ml/kg -annostelua ml/koira -annostelun sijaan (Melamies ym. 2011). Näytteenotto on onnistunut, kun näytettä saadaan noin 50 % ruiskutetun nesteen määrästä, ja mikäli näytteen pinnalle muodostuu kerros vaahtomaista surfaktanttia. Tällöin neste on käynyt alveoleissa asti (Finke 2013). Näytteenotossa aseptiikkaan on syytä kiinnittää huomiota, sillä BAL-näytteiden bakteeriviljelyssä voi esiintyä virhepositiivisia tuloksia, mikäli näyte on kontaminoitunut suun bakteereilla (Chan ym. 2013). Aseptiikan varmistamiseksi hengitysteiden visuaalisen tutkimisen ja näytteenoton välissä endoskooppi myös puhdistetaan (Finke 2013). BAL-näytteenotossa riskeinä ovat happisaturaation aleneminen, bronkospasmi ja spontaani pneumothorax, jotka tulee ottaa huomioon, etenkin, jos potilaan normaali hengitys on vaarantunut jo ennen tutkimusta (Finke 2013). On myös muistettava, että sairas keuhkokudus on herkempi vaurioille, joten varovaisuutta on noudatettava tutkimuksen yhteydessä (Creevy 2009).

Bakteriologisia (Creevy 2009) ja sytologisia tutkimuksia voidaan tehdä myös ottamalla irtosolunäytteitä keuhkoputkista pienillä harjamaisilla näytteenottovälineillä (engl. bronchial brushing) endoskopoinnin yhteydessä (Hawkins 2006). Tutkimuksessaan

Zhu ym. (2015) kuitenkin totesivat BAL:n olevan sytologisten tulehdusmuutoksien diagnosoinnissa sensitiivisempi tutkimusmenetelmä kuin harjanäytteenotto, vaikkakin harjanäyte voi antaa lisätietoa hengitysteiden tilasta (Zhu ym. 2015), sillä näytteisiin saadaan mukaan myös soluja, jotka ovat kiinni hengitysteiden limakalvossa eivätkä irtoa BAL-näytteeseen (Creevy 2009). Mikäli potilaalta otetaan sekä BAL, että harjanäyte, tulisi BAL ottaa ensin, jotta harjanäytteenotossa mahdollisesti aiheutuva verenvuoto ei häiritse näytteen tutkimista (Creevy 2009).

Mikäli potilasta ei jostain syystä voida nukuttaa, on mahdollista ottaa hereillä olevalta (Creevy 2009, Finke 2013), yhteistyöhaluiselta, keskikokoiselta tai suurelta koiralta (Creevy 2009) keuhkoputkesta huuhtelunäyte neulan ja pitkän laskimokatetrin avulla (engl. transtracheal wash, TTW) (Creevy 2009, Finke 2013). Mikäli potilaalla on kuitenkin dyspnea tai potilaalla on riski muuttua dyspneiseksi stressin seurauksena, ei TTW ole suositeltu menetelmä (Creevy 2009). Toimenpide tulee suorittaa aseptisia tapoja ja paikallispuudutusta käyttäen (Creevy 2009, Finke 2013). Henkitorveen työnnetään ensin neula joko rengas-kilpirustositeen (engl. cricothyroid ligament) läpi tai kahden ensimmäisen rustorenkkaan välistä. Sen jälkeen neulan läpi asetetaan pitkä laskimokatetri ja neula poistetaan (Creevy 2009, Finke 2013). Katetrin asettamisen jälkeen 5-20 ml steriiliä keittosuolaliuosta ruiskutetaan henkitorveen. Koska hereillä olevalla koiralla säilyy yskänrefleksi, alkaa koira yleensä yskiä nesteen ruiskuttamisen jälkeen (Creevy 2009). Mikäli näin ei tapahdu, voidaan käyttää coupagea apuna yskän aikaansaamiseksi (Creevy 2009, Finke 2013). Yskän avulla näytemateriaalia saadaan usein myös henkitorven alapuolisista hengitysteistä. Koiran yskiessä aspiroidaan näytettä ruiskulla mahdollisimman paljon (Creevy 2009). Usein saatu näytemäärä on noin 10 % tai alle käytetystä nestemäärästä (Creevy 2009, Finke 2013). Näytteenoton jälkeen potilaan kaulalle asetetaan tukeva side noin tunnin ajaksi, ihonalaiskudoksen emfyseeman muodostumisen minimoimiseksi (Creevy 2009, Finke 2013). Pienten koirien ja kissojen henkitorven pieni koko tekee TTW:n suorittamisesta haasteellista (Finke 2013), joten niille sekä yhteistyöhaluttomille koirille suositellaan ennemmin tehtäväksi keuhkoputken huuhtelunäytteenotto (engl. endotracheal wash, ETW) yleisanestesiassa ja intuboituna (Creevy 2009). Potilaan hengityspotken kautta viedään steriilisti pitkä laskimokatetri henkitorveen ja otetaan näyte steriiliä keittosuolaliuosta ja ruiskua käyttäen kuten TTW:ssä (Creevy 2009, Finke 2013).

Nukutetulta potilaalta puuttuu kuitenkin yskänrefleksi, jolloin näytettä saadaan todennäköisemmin vain henkitorvesta kuin alemmista hengitysteistä (Finke 2013). Lisäksi toimenpide tehdään sokkona, kuten myös TTW, jolloin näytteenottokohdasta ei voida varmistua (Creevy 2009). Tästä syystä alempaa hengitysteistä otettava BAL-näyte on usein informatiivisempi kuin ETW- ja TTW-näytteet. ETW-näytteenottoon liittyy myös bronkospasmin mahdollisuus, mikä on huomioitava toimenpidettä suoritettaessa (Finke 2013).

Keuhkoputkien pinnalta voidaan ottaa myös koepaloja endoskoopin avulla. Koepaloja otetaan yleisimmin silloin, kun tutkimuksessa löytyy noduloita tai massoja, ei niinkään tulehdusepäilyjen yhteydessä. Koepalojen ottoon liittyy verenvuodon ja perforaation riski, joten se on vähiten käytetty bronkoskooppinen näytteenottomenetelmä (Creevy 2009).

On mahdollista ottaa myös aspiraatio-/ohutneulanäyte keuhkoista rintakehän seinämän läpi (engl. transthoracic needle aspiration). Näytteenotto ei vaadi yleisanestesiaa, mikäli potilas on rauhallinen. Näytteenottokohdan (poikkeama keuhkokudoksessa) valitsemiseen käytetään usein apuna röntgeniä tai ultraääntä. Mikäli keuhkoissa on diffuuseja muutoksia, valitaan usein kaudaalilohko näytteenottokohdaksi (Hawkins 2009). Aseptisia toimintatapoja ja paikallispuudutusta tulee käyttää. Näytteenottoneulana käytetään useimmiten 22-G spinaalineulaa. Näytettä voidaan aspiroida ruiskulla ja lisäksi tehdä muutama pisto keuhkokudokseen. Pistojen on oltava nopeita viiltohaavojen ja verenvuodon välttämiseksi, sillä keuhkot liikkuvat hengityksen tahdissa. Neula vedetään rintaontelosta ulos pitämällä pientä negatiivista painetta ruiskussa (Hawkins 2009). Mahdollisia komplikaatiota näytteenotolle ovat ilmarinta (engl. pneumothorax), veririnta (engl. hemothorax) ja keuhkoverenvuoto (Hawkins 2009).

2.3 Terveen koiran hengitysteiden anatomia ja mikrobisto

2.3.1 Ylähengitystiet

Koiran ylähengitysteihin lasketaan kuuluvaksi nenäontelo sivuonteloihin, nielu (engl. pharynx) ja kurkunpää (engl. larynx). Nenäontelon jakaa kahteen osaan väliseinä (Dyce ym. 2010, Aspinall ym. 2015). Väliseinän kaudaaliset sekä dorsaaliset osat ovat luiset, mutta rostraaliset osat ovat puolestaan rustoiset, mikä mahdollistaa kirsun liikkumisen (Dyce ym. 2010). Nenäontelossa sijaitsevat myös monimutkaiset nenäkuorikot (Dyce ym. 2010, Aspinall ym. 2015), jotka osallistuvat hajuaistimuksen muodostumiseen (Dyce ym. 2010) sekä lämmittävät ja kosteuttavat hengitettyä ilmaa (Aspinall ym. 2015). Nenäontelosta poiketen nenän sivuontelot ovat koiralla heikosti kehittyneet (Dyce ym. 2010). Onteloiden ja nenäkuorikoiden pintaa peittää värekarvainen limakalvoepiteeli, joka yhdessä liman kanssa auttavat keräämään hengitysilmaista erilaisia epäpuhtauksia. Kertynyt lima liikkuu värekarvojen avulla kohti nielua, josta se niellään mahalaukkuun (Aspinall ym. 2015). Nielu on ruoansulatuskanavan ja hengitysteiden yhtymäkohta, jonka pehmeä kitalaki jakaa nenänieluun (engl. nasopharynx) ja suunieluun (engl. oropharynx) (Aspinall ym. 2015). Normaalisessa hengityksessä pehmeä kitalaki lepää kielen päällä siten, että hengitysilma pääsee vapaasti kulkemaan kurkunpään kautta henkitorveen (Dyce ym. 2010). Kurkunpää koostuu erilaisista rustorakenteista, joista rostraalisin on kurkunkansi (engl. epiglottis) (Aspinall ym. 2015). Kurkunkansi sulkee henkitorven nielaisun aikana, jotta nieltä ruoka päätyy mahalaukkuun eikä henkitorveen (Dyce ym. 2010). Kurkunpäähän kuuluvat myös kilpirusto ja rengasrusto (Dyce ym. 2010), sekä äänihuulet (Dyce ym. 2010, Aspinall ym. 2015).

Terveen koiran ylähengitysteissä on hyvin moninainen bakteeristo (Tress ym. 2017). Tress ym. (2017) tekivät laajan kartoituksen oireettomien koirien nenäontelon bakteereista. Yleisimpiä bakteerisukuja, joita he löysivät, olivat *Moraxellaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Neisseriaceae*, *Cardiobacteriaceae*, *Pasteurellaceae*, *Staphylococcaceae* ja *Streptococcaceae*. He myös totesivat tutkimuksessaan, että

vanhempien koirien nenäontelossa on huomattavasti nuoria koiria laajempi bakteerikirjo. (Tress ym. 2017). On tehty myös tutkimuksia siitä, esiintyykö koirien kennelyskään (canine infectious respiratory disease, CIRI) liitettyjä patogeenisiä bakteereja ja viruksia oireettomien koirien nenäontelossa ja nielussa. Tuloksena on saatu, että oireettomista koirista 47,7 - 52,5 %:lta on saatu eristettyä vähintään yksi näistä mikrobeista (Schultz ym. 2014, Lavan ja Knesl 2015). Lavan ja Knesl (2015) pohtivat tutkimuksessaan, että vaikka näytteet olivat kerätty koiratarhoilta, eivätkä he voineet tutkimuksessaan poissulkea esimerkiksi subkliinisten tai paranemassa olevien tartuntojen mahdollisuutta (jolloin koirat olisi tulkittu virheellisesti terveiksi), voi löydös kuitenkin olla merkittävä. Sillä jos koira kantaa kyseisiä patogeeneja, voi se olla alttiimpi sairastumaan kliiniseen tautiin esimerkiksi stressin seurauksena (Lavan ja Knesl 2015). Lisäksi oireeton kantaja voi levittää patogeeneja muihin koiriin (Schultz ym. 2014). Toisaalta molemmissa tutkimuksissa käytettiin mikrobien tutkimiseen tavallista PCR-menetelmää, jolloin löydettyjen mikrobien kliinistä merkitystä on vaikea arvioida.

Oireettomien koirien nenäontelosta on löydetty vaihtelevia määriä *Mycoplasma*-suvun bakteereja. Mycoplasmojen osuus suhteutettuna muihin nenäontelon bakteereihin on vaihdellut 0,1 % ja 27,99 % välillä (Tress ym. 2011, Ericsson ym. 2016). Rosendal (1973) tutki mycoplasmojen esiintyvyyttä sekä terveillä, että sairailta koirilla. Terveiden koirien nielunäytteistä 31/32 (96,8 %) ja kurkunpään näytteistä 6/7 (85,7 %) olivat positiivisia mycoplasma-tiljelyn osalta (Rosendal 1973). Samankaltaisia tuloksia saivat myös Randolph ym. (1993), joiden tutkimuksessa mycoplasmoja löytyi kaikkien tutkittujen, oireettomien (n = 26) koirien nielusta tehdyistä bakteeriviljelyistä (Randolph ym. 1993) ja Joffe ym. (2016), jotka löysivät 73 %:lla oireettomista kontrollikoirista *Mycoplasma cynos* (*M. cynos*) -bakteeria nielunäytteistä PCR-tutkimuksessa (Joffe ym. 2016). Myös Chalker ym. (2014) löysivät useita eri mycoplasma-lajeja oireettomien koirien nielurisoista tehdyistä bakteeriviljelyistä (Chalker ym. 2014). Mycoplasmoja pidetäänkin nykytiedon valossa ylähengitysteissä koiran normaaliin mikrobistoon kuuluvana (Rosendal 1982, Bemis 1992).

2.3.2 Alahengitystiet

Alahengitysteihin kuuluvat henkitorvi, keuhkoputket ja keuhkot (Dyce ym. 2010). Keuhkot jaetaan vasemman- ja oikeanpuoleiseen keuhkoon. Vasen keuhko koostuu kraniaalisesta ja kaudaalisesta keuhkolohkosta, kun taas oikea keuhko koostuu kraniaalisen ja kaudaalisen keuhkolohkon lisäksi keski- ja välilohkosta (Dyce ym. 2010).

Kurkunpäästä hengitysilma päätyy ensimmäisenä henkitorveen, joka kulkee ruokatorven ventraalipuolella (Aspinall ym. 2015) ja on helposti tunnusteltavissa jäməkän rustorakenteensa vuoksi (Dyce ym. 2010). Rengasrakenteinen henkitorvi (Dyce ym. 2010) koostuu C-kirjaimen mallisista rustoista, joita yhdistää henkitorven dorsaalipuolella side- ja lihaskudos (Aspinall ym. 2015). Joustavan rengasrakenteen vuoksi henkitorvi kapenee hieman sisäänhengityksen aikana ja palautuu normaaliksi uloshengityksessä (Dyce ym. 2010). Henkitorven sisäpintaa verhoaa värekarvallinen limakalvoepiteeli, jonka pinnalla on ohut kerros limaa. Kuten ylähengitysteissä, myös henkitorvessa lima kertyy hengitysilmaasta epäpuhtauksia ja värekarvojen liikkeen avulla lima sekä epäpuhtaudet kuljetetaan ylöspäin kohti nielua, josta ne niellään mahalaukkuun (Aspinall ym. 2015). Lima itsessään myös ärsyttää henkitorvea ja aiheuttaa yskänrefleksiä (Aspinall ym. 2015). Yskänrefleksiä aiheuttavat myös mm. alahengitysteiden vieras materiaali, inflammaatio ja ulkopuolinen paine (Hawkins 2009). Yskänrefleksin avulla saadaan ylimääräistä limaa ja erilaisia partikkeleita poistettua hengitysteistä, mikä on tärkeä hengitysteiden puolustusmekanismi (Aspinall ym. 2015). Henkitorvi haarautuu vasempaan ja oikeaan keuhkoputkeen (Aspinall ym. 2015) yleensä viidennen tai kuudennen kylkiluun alapuolelta (Dyce ym. 2010). Keuhkoputket koostuvat täydellisistä rustorenkaista, mutta niiden ruston määrä vähenee sitä mukaa, kun keuhkoputket haarautuvat aina pienemmiksi ja pienemmiksi ilmatiehyiksi jatkuessaan syvemmälle keuhkokudokseen (Aspinall ym. 2015). Rustoa ei enää ole lainkaan alueella, jossa ilmatiehyet muuttuvat keuhkorakkuloiksi. Keuhkorakkulat ovat ohutseinäisiä umpipusseja ja muistuttavat rakenteeltaan viinirypäleterttua. Niiden seinämä koostuu erittäin ohuesta epiteelikerroksesta, joka mahdollistaa kaasujen vaihdon hengitysilman ja verenkierron välillä. Keuhkorakkuloita

ympäröikin tiheä hiussuoniverkosto. Yhdessä keuhkossa on miljoonia keuhkorakkuloita, tarjoten laajan pinta-alan kaasujenvaihdolle (Aspinall ym. 2015).

Terveen koiran alahengitystiet eivät ole aina steriilit (Pecora 1976, Lindsey ja Pierce 1978, McKiernan ym. 1982). Oireettomien koirien BAL-näytteistä on löydetty runsaasti eri sukuihin kuuluvia bakteereja. Alahengitysteissä olevat bakteerimäärät ovat kuitenkin huomattavasti pienempiä kuin ylähengitysteissä (Ericsson ym. 2016). Tutkimuksessaan Lindsey ja Pierce (1978) havaitsivat, että 37 %:lla tutkituista koirista esiintyi aerobisia ja fakultatiivisesti anaerobisia bakteereja keuhkoissa. Keskimääräinen eristetty bakteerimäärä oli $1,2 \times 10^3$ organismia grammassa keuhkokudosta (Lindsey ja Pierce 1978). McKiernan ym. (1982) saivat samankaltaisia tuloksia: oireettomilta koirilta 34,3 % löytyi viljelyssä bakteerikasvua henkitorvesta otetuissa näytteissä (McKiernan ym.. 1982). Pecora (1976) puolestaan havaitsi tutkimuksessaan, että bakteeriviljelyissä oli kasvua 76 % TTW-näytteistä, 34 % keuhkojen ohutneulanäytteistä ja 63 % keuhkojen koepaloista (Pecora 1976). Eristetyt bakteerilajit hieman poikkeavat toisistaan tutkimusryhmien välillä. McKiernanin ym. (1982) kolme yleisintä bakteerilajia tai -sukua olivat *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. ja *Pasteurella multocida* (McKiernan ym. 1982), kun taas Pecoran (1976) yleisimmät löydökset olivat *Staphylococcus* spp., *Enterobacter* spp. ja *Bordetella bronchiseptica* (Pecora 1976). Mielenkiintoinen havainto on myös se, että keuhkoista eristetyistä bakteerilajeista 74 % ja henkitorvesta eristetyistä bakteerilajeista 80 % on löytynyt myös saman koiran nielusta, joten on mahdollista, että ylähengitysteistä siirtyy bakteereita alempiin hengitysteihin hengityksen mukana (Lindsey ja Pierce 1978, McKiernan ym. 1982). Tätä olettamusta tukee myös Randolphin ym. (1993) havainto, että kaikilla koirilla, joilla *Mycoplasma*-suvun bakteereja löytyi BAL-näytteestä, löytyi niitä myös nielusta (Randolph ym. 1993).

Mycoplasmojen esiintyvyydelle terveiden koirien alahengitysteissä on saatu hieman ristiriitaisia tuloksia. Tutkimuksessaan Randolph ym. (1993) löysivät oireettomien koirien BAL-näytteistä tehdyistä bakteeriviljelyistä 27 %:sta *Mycoplasma*-suvun bakteereja (Randolph ym. 1993), kun taas Rosendal (1973) ei löytänyt yhtenkään tutkitun, oireettoman koiran keuhkokudoksesta mycoplasmoja (Rosendal 1973).

Chalker ym. (2004) puolestaan löysivät useita eri mycoplasmalajeja oireettomien koirien sekä henkitorven, että keuhkoputkien huuhtelunäytteistä tehdyistä bakteeriviljelyistä (Chalker ym. 2004). Tutkimusten perusteella näyttäisi siltä, että ainakin osalla koirista *Mycoplasma*-suvun bakteerit voivat kuulua osaksi alahengitysteiden normaaliflooraa (Randolph ym. 1993, Chalker ym. 2004).

2.4 Mycoplasmojen rooli hengitystiesairauksissa

Ensimmäisen kerran *Mycoplasma*-suvun bakteerit liitettiin koiran alahengitystiesairauksiin vuonna 1972, kun Rosendal eristi mycoplasmoja keuhkotulehdukseen sairastuneen koiran keuhkokudoksesta. Silloin ei ollut vielä tiedossa mikä mycoplasmalaji oli keuhkotulehduksen aiheuttanut, sillä laji oli ennen tunnistamaton (Rosendal 1972). Samana vuonna julkaistiin myös toinen tutkimus, jossa Armstrong ym. (1972) löysivät bakteeriviljelyssä viideltä keuhkotulehdukseen sairastuneilta koirilta yhden tai useampia *Mycoplasma*-suvun bakteereita (Armstrong ym. 1972). Rosendal teki myös vuonna 1973 tutkimuksen, jossa hän vertaili mycoplasmojen esiintymistä terveillä ja sairailta koirilla. Tutkimuksessa hän havaitsi, että keuhkotulehdusta sairastavista kahdeksasta koirasta seitsemältä löytyi bakteeriviljelystä *Mycoplasma*-suvun bakteereja, kun terveiden keuhkoista mycoplasmoja ei löytynyt lainkaan (Rosendal 1973).

Mycoplasmojen roolista primaarisena tai sekundaarisen taudinaiheuttajana ei ole saatu yksiselitteisiä tuloksia ja rooli on edelleen epäselvä. Mycoplasmoja on löydetty sekä ainoana taudinaiheuttajana bakteriellin keuhkotulehdukseen (Chandler ja Lappin 2002, Zeugswetter ym. 2007, Viitanen ym. 2015), että myös osana sekainfektiota (Randolph ym. 1993, Chandler ja Lappin 2002, Johnson ym. 2013, Viitanen ym. 2015).

Eri mycoplasmalajien patogeenisuutta on myös tutkittu. Rosendal (1978) teki kokeellisen tutkimuksen, jossa viikon ikäisiä koiranpentuja infektoidiin seuraavilla mycoplasmalajeilla: *M. cynos*, *Mycoplasma canis* (*M. canis*), *Mycoplasma spumans*

(*M. spumans*), *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*) ja *Mycoplasma gatae* (*M. gatae*). *M. cynos* oli ainut, joka sai aikaan voimakkaan keuhkotulehduksen. *M. bovis* aiheutti lieviä tulehdusmuutoksia ja muut mycoplasmat eivät aiheuttaneet tulehdusta lainkaan (Rosendal 1978). Rosendalin tutkimuksessa vuonna 1972 keuhkotulehduksen aiheuttaneen, silloin tunnistamattomaksi jääneen mycoplasmalajin todettiin myöhemmin olleen myös *M. cynos* (Rosendal 1982).

2.4.1 *Mycoplasma* spp. ja canine infectious respiratory disease

Canine infectious respiratory disease (CIRD) eli kennelyskä on akuutti, tarttuva hengitystiesairaus (Buonavoglia ja Martella 2007, Priestnall ym. 2014). Sairaudesta käytetään myös nimitystä tarttuva henkitorven ja keuhkoputkien tulehdus (engl. infectious tracheobronchitis, ITB). Sairaus vaikuttaa suurimmaksi osaksi nieluun, henkitorveen ja keuhkoputkiin, mutta toisinaan myös nenäontelon limakalvoon ja alempiin hengitysteihin (Buonavoglia ja Martella 2007). Oireina on tyypillisesti kohtauksittainen kuiva yskä (Erles ym. 2004, Buonavoglia ja Martella 2007) ja hengitysvaikeudet. Oireiden vakavuus vaihtelee lievästä voimakkaaseen (Buonavoglia ja Martella 2007). Oirekuvaan liittyy myös limaneritystä, nenävuotoa (Buonavoglia ja Martella 2007, Schultz ym. 2014) ja niiskutusta (Schultz ym. 2014). Kennelyskä on yksi yleisimmistä koirien tarttuvista sairauksista (Buonavoglia ja Martella 2007) ja sitä esiintyy erityisesti paikoissa, jossa koirat ovat tiiviissä kontaktissa keskenään, esimerkiksi kenneleissä ja löytöeläinkodeissa (Erles ym. 2004). Kennelyskällä on monitekijäinen etiologia (Buonavoglia ja Martella 2007, Priestnall ym. 2014) ja siihen on liitetty useita eri viruksia sekä bakteereja (Buonavoglia ja Martella 2007, Lavan ja Knesl 2015). Kennelyskän etiologiaa monimutkaistaa se, että sairautta aiheuttavien patogeenien osuudet voivat vaihdella eri taudinpurkauksissa (Erles ym. 2004). Kennelyskä on kuitenkin useimmiten itsestään rajoittuva, pääosin virusten aiheuttama infektio, mutta toisinaan se voi kehittyä vakavaksi bakterielliseksi bronkopneumoniaksi (Buonavoglia ja Martella 2007), johon liittyy jopa kuolemanriski (Erles ym. 2004, Buonavoglia ja Martella 2007). Vakavissa taudinkuvissa onkin usein useampi kuin yksi taudinaiheuttaja mukana (Priestnall ym. 2014). Kennelyskä voi esiintyä myös

subkliinisena, jolloin useimmiten taudinaiheuttajia on vain yksi (Buonavoglia ja Martella 2007).

Koirien kennelyskään on yhdistetty seuraavia taudinaiheuttajia: canine parainfluenza virus (CPIV), canine influenza virus, canine adenovirus tyyppi-2 (CAV-2), canine herpesvirus (CHV), canine respiratory coronavirus (CRCoV) (Buonavoglia ja Martella 2007), canine pneumovirus (CnPnV) (Priestnall ym. 2014), *Bordetella bronchiseptica* (*B. bronchiseptica*) (Schultz ym. 2014) ja *Streptococcus equi* sp. *zooepidemicus* (*Str. zooepidemicus*) (Priestnall ym. 2014). Näistä CPIV on yleisimmin löydetty virus alahengitystiesairautta sairastavilta koirilta (Schultz ym. 2014, Viitanen ym. 2015, Decaro ym. 2016). Yleinen on myös *B. bronchiseptica*, jota on tutkimuksissa löydetty jopa 78,7 %:lta kennelyskään sairastuneista koirista. Näistä 52,1 %:lla *B. bronchiseptica* on ollut ainoa löydetty patogeeni (Schultz ym. 2014).

M. cynosin yhteys koirien kennelyskään todistettiin vuonna 2004 Chalkerin ym. toimesta. He tutkivat eri mycoplasmalajien esiintyvyyttä terveillä ja sairailta koirilla, sekä eri lajien yhteyttä hengitystieoireisiin. Vaikka kennelyskäoireilevien koirien alahengitysteistä löytyi useita eri mycoplasmalajeja, ainoa mycoplasmalaji, jolle löytyi tilastollisesti merkitsevä yhteys kennelyskäoireiluun, oli *M. cynos*. (Chalker ym. 2004).

Vuonna 2016 Decaro ym. tutkivat kennelyskäoireilevilta koirilta ylähengitystienäytteitä real-time-PCR:llä. Mycoplasmoista *M. canis*-bakteeria löytyi 8,98 % ja *M. cynos*-bakteeria 7,70 % tutkituista koirista (Decaro ym. 2016). Myös jopa 81 % *M. cynos* -prevalensseja on löydetty kennelyskäoireilevien koirien nielunäytteissä PCR-tutkimuksissa (Joffe ym. 2016). Toisaalta on otettava huomioon, että sama tutkimusryhmä löysi oireettomiltakin koirilta *M. cynosia* 73 %:lta (Joffe ym. 2016). Vaikka PCR-tutkimus ei kerro suoraan taudinaiheuttajien kliinisestä merkityksestä, Decaron ym. (2016) tutkimuksessa selvitettiin myös taudinaiheuttajien yhteyttä koirien oireisiin ja tutkimusryhmä yhdisti tutkimustulostensa perusteella voimakkaampiin hengitystieoireisiin *M. cynos*-infektion yksittäisenä tai yhdistettynä joko CRCoV:n tai *M. canisiin* (Decaro ym. 2016). Rycroft ym. (2006) puolestaan tutkivat löytöeläinkotiin

muuttavien koirien *Mycoplasma*-vasta-aineita ja niiden yhteyttä hengitystieoireisiin. 62 % koirista sairastui hengitystieoireisiin kolmen viikon sisällä löytöeläinkotiin saapumisesta ja näistä 46 % oli seropositiivisia *M. cynosille*. Lisäksi vasta-ainetasojen nousu oli verrannollinen paheneviin hengitystieoireisiin. Löydös viittaa siihen, että *M. cynos* voi olla merkittävä tekijä koirien kennelyskän puhkeamisessa (Rycroft ym. 2006). Randolph ym. (1993) puolestaan löysivät merkittävän yhteyden mycoplasmojen ja *B. bronchiseptica* välillä: koirilla esiintyy useammin mycoplasmoja, jos niillä on samanaikainen *B. bronchiseptica*-infektio (Randolph ym. 1993). Samanlaisia havaintoja tekivät myös Johnson ym. (2013). Nämä löydökset voivat viitata mycoplasmojen mahdolliseen rooliin sekundaarisena taudinaiheuttajana (Randolph ym. 1993). Vuonna 2006 Williams ym. kuvasivat tapauksen, jossa heille tuli jatkotutkimuksiin hengitystieoireileva 4 kuukauden ikäinen bokseri. Koiralla oli aiemmin diagnosoitu kennelyskä ja sisäloisinfektio. Koiralta otettiin TTW-näyte, jonka sytologian perusteella heräsi epäily *Mycoplasma*-infektiosta (kuvassa näkyi pieniä, pleomorfisia kokkoideja organismeja). Näytteestä tehtiin mycoplasma-viljely, josta eristettiin *Mycoplasma*-suvun bakteereita, mutta myös *Escherichia coli* (jota sittemmin epäiltiin todennäköiseksi kontaminantiksi). Tutkimusryhmä pohti, että vaikka ei voida sanoa olivatko *Mycoplasma*-suvun bakteerit olleet primaareja vai sekundaarisia taudinaiheuttajia, mycoplasmat olivat luultavasti komplisoineet nuoren koiran kennelyskää (Williams ym. 2006). On kuitenkin huomioitava, että muita mikrobiologisia tutkimuksia ei tehty, joten muiden mikrobien osuutta potilaan taudinkuvaan ei voida arvioida.

Kennelyskän ja mycoplasmojen tartuntareitteihin liittyen Chalker ym. (2004) tekivät mielenkiintoisen havainnon, että ainut mycoplasma-laji, jota on eristetty kennelin sisäilmasta, on ollut *M. cynos* (Chalker ym. 2004). Löydös voi olla merkittävä, kun mietitään mycoplasmojen leviämistä yksilöstä toiseen. Bakteerien mahdolliseen säilymiseen kennelissä saatiin myös viitteitä Manneringin ym. (2009) tutkimuksen perusteella. He tutkivat BAL-näytteistä ja keuhkoputken huuhtelunäytteistä (engl. tracheal lavage, TL) bakteeriviljelyissä eristettyjen *M. cynos* -bakteerien geneettisiä samankaltaisuuksia. Näytteet olivat otettu muutaman kuukauden välein samassa kennelissä olleista koirista, joilla oli hengitystieoireita. Tutkimuksessa selvisi, että nämä eri koirilta löydetty *M. cynos* -bakteerit olivat geneettisiltä ominaisuuksiltaan hyvin

samankaltaisia, vaikka eri koirien kennelissä olon välissä oli joitakin kuukausia, eivätkä koirat olleet siis kontaktissa keskenään (Mannering ym. 2009).

2.4.2 Mycoplasmojen osuus kroonisissa hengitystiesairauksissa

2.4.2.1 Krooninen riniitti

Kroonisesta riniitistä kärsivillä koirilla nenäontelosta on löydetty runsaammin *Mycoplasma*-suvun bakteereita kuin terveillä koirilla, samoin nenäontelon kasvainsairauksien yhteydessä (Tress ym. 2017). Kuitenkaan mycoplasmojen osuuteen taudinaiheutuksessa ei tässä tutkimuksessa otettu kantaa, etenkin, koska nenäontelossa on niin moninainen mikrobisto, joka kokonaisuutena poikkeaa kroonisen riniitin ja kasvainsairauksien yhteydessä verrattuna terveisiin koiriin. Lisäksi mycoplasmojen osuus nenäontelon kokonaismikrobistosta on kuitenkin huomattavan pieni, noin 0,1-1,9 % myös sairailta koirilla (Tress ym. 2017). Vuonna 2006 julkaistussa tutkimuksessa Windsor ym. tutkivat mm. mycoplasmojen osuutta koirien idiopaattiseen lymfoplasmasyyttiseen riniittiin, joka on yksi koirien kroonisista nenäontelon sairauksista. Tutkimukseen otettiin mukaan 37 koiraa, eikä yhdenkään koiran nenäontelosta otetuista koepaloista löytynyt *Mycoplasma*-suvun bakteereja. He pohtivat, että joko näytteet eivät olleet edustavia, tutkimusmenetelmät eivät löytäneet kudoksista mycoplasmoja tai sitten mycoplasmoilla ei ole osuutta kyseisen sairauden synnyssä (Windsor ym. 2006).

2.4.2.2 Krooninen yskä

Johnson ym. (2013) tutkivat alempien hengitysteiden sairaudesta kärsivien koirien BAL-näytteiden sytologiaa ja mikrobiologiaa. Tutkituista potilaista suurimmalla osalla oli kroonista yskää ja koirista vain 19/105 (18 %) yskä oli kestänyt alle viikon. Tutkimuksen heikkoutena kuitenkin on se, että tuloksissa ei eritelty mitkä tutkituista näytteistä olivat peräisin akuutista yskästä kärsivistä koirista. Tutkimuksessa

bakteeriviljelyiden tuloksena kuitenkin oli, että useimmiten hengitysteistä eristettiin mycoplasmoja, joita löytyi 30/99 (30 %) koirista. Näistä koirista yhdeksällä *Mycoplasma* spp. oli ainoa bakteerilöydös. On kuitenkin huomioitava, että näistä yhdeksästä koirasta viittä oli lääkitty beetalaktaameilla näytteenottohetkellä, mikä voi vaikuttaa tutkimustuloksiin (Johnson ym. 2013). Koska beetalaktaameilla ei ole tehoa soluseinättömiin mycoplasmoihin (Bemis 1992), voi beetalaktaamien käyttö suosia mycoplasmoja hengitysteissä (Johnson ym. 2013). Muita usein löydettyjä bakteereja ja bakteerisukuja olivat *B. bronchiseptica* (22 % koirista), *Pasteurella* spp. (21 %), *Enterobacteriaceae* (20 %) ja aerobiset bakteerit (17 %) (Johnson ym. 2016).

Krooninen alahengitystieinfektio altistaa myös hengitystiekollapsille. Tämä huomioiden on epäilty mycoplasmojen aiheuttaneen kroonista bronkiittia ja edelleen hengitystiekollapsia, sillä mycoplasmoja on löydetty ainoana taudinaiheuttajana kollapsipotilaiden TTW- ja BAL-näytteistä. Löydöksen tehneet Chandler ja Lappin (2002) pohtivat, että mikäli alahengitystiet olisivat kolonisoituneet bakteereilla hengitystiekollapsin jälkeen, olisi hengitysteistä luultavasti eristetty myös muita bakteereita kuin mycoplasmoja (Chandler ja Lappin 2002). Toisaalta mycoplasmojen yhteyttä kroonisiin infektioihin voi olla hankala tutkia, samoin mycoplasmojen eristäminen kroonisista potilaista, sillä Rosendal (1978) totesi *Mycoplasma*-infektion hävinneen 4-5 viikkoa infektion jälkeen tai ainakaan bakteeria ei saatu eristettyä keuhkokudoksesta (Rosendal 1978). Chalkerin ym. (2004) tutkimuksessa myös kolmen viikon kennelissä oleskelun jälkeen löydettyjen mycoplasmojen määrä lähti tutkimuskoirilla laskuun (Chalker ym. 2004). Jameson ym. (1995) puolestaan tutkivat bakteriellin pneumonian ja mycoplasmojen välisiä yhteyksiä. He havaitsivat tutkimuksessaan, että *Mycoplasma*-positiivisista koirista 56,9 % oli myös muita klinisiä ongelmia: muun muassa megaesofagusta, kilpirauhasen vajaatoimintaa, larynxparalyysiä ja trakeakollapsia. Mutta tutkimuksessaan he havaitsivat myös, että samoja ongelmia oli 57,6 % *Mycoplasma*-negatiivisista koirista (Jameson ym. 1995).

2.4.3 Mycoplasmojen osuus bakteeriperäisen pneumonian aiheuttajana

Pneumonialla tarkoitetaan keuhkojen tulehdusta, joka voi olla joko virusten tai bakteerien aiheuttama (Hawkins 2009). Bakteeriperäinen pneumonia on koirilla melko yleinen (Hawkins 2009). Pneumoniassa tyypillisiä hengitystieoireita ovat yskä, molemminpuolinen mukopurulentti nenävuoto, hengitysvaikeudet (Hawkins 2009, Hanel ja Hansen 2014) ja tihentynyt hengitys (Hanel ja Hansen 2014). Myös systeemioireita voi esiintyä, kuten esimerkiksi kuumetta, ruokahaluttomuutta, väsymystä, rasituksensietokyvyn alenemista (Hawkins 2009, Hanel ja Hansen 2014) ja painonlaskua (Hawkins 2009). Hengitysteiden auskultaatiossa kuuluu usein epänormaaleja hengityssääniä (Hawkins 2009, Hanel ja Hansen 2014).

Jameson ym. (1995) tekivät retrospektiivisen tutkimuksen, jossa he selvittivät mycoplasmojen osuutta koirien bakteriellissä pneumoniassa. Tutkimuksessa potilaita oli otettu TTW-näytteet, jotka olivat viljelty sekä mycoplasmojen, että aerobisten bakteerien varalta. *Mycoplasma*-suvun bakteereita löytyi ainoana taudinaiheuttajana 7,5 % koirista ja yhdessä aerobisten bakteerien kanssa 62,4 % koirista. Suurimmalla osalla *Mycoplasma*-positiivisista koirista oli siis kyseessä sekainfektio (Jameson ym. 1995). Samankaltaisia tuloksia saivat Viitanen ym. (2015): *Mycoplasma* spp. oli ainoa löydös 9,1 % koirista ja yhdessä *Pasteurella*-suvun bakteerien kanssa se löytyi 27,3 % koirista (Viitanen ym. 2015). Myös Tartin ym. (2010) tutkimuksessa mycoplasmoja oli useammin sekainfektiossa kuin ainoana taudinaiheuttajana. He tutkivat aspiraatiopneumoniaan sairastuneiden koirien alahengitystienäytteistä tehtyjä bakteeriviljelyitä. Mycoplasmoja löytyi 10/47 (21,3 %) koirista ja *Mycoplasma* spp. oli ainoa löydös vain kahdella koiralla (4,3 %). Toisaalta täytyy myös huomioida, että näytteissä, joissa ylipäättään oli kasvua bakteeriviljelyssä, 58,3 % kasvoi kahta tai useampaa organismia (Tart ym. 2010). Mycoplasmojen esiintyvyydestä tuloksiin vaikuttaa varmasti myös se, onko bakteeriviljelyissä huomioitu mycoplasmojen erityiset kasvuvaatimukset. Tutkimuksessaan Angus ym. (1997) eivät tehneet erikseen mycoplasmaiviljelyitä ja he eristivät alahengitystiesairaudesta kärsiviltä koirilta

mycoplasmoja vain 2,9 %:lta (Angus ym. 1997), eli huomattavasti harvemmalta kuin kolme aiempaa tutkimusryhmää.

Viitteitä *M. cynosin* potentiaalista aiheuttaa vakavia tulehdusmuutoksia pienille pennuille saatiin Rosendalin ja Vintherin (1977) kokeellisessa tutkimuksessa, jossa pentujen alahengitystiet infektoitiin *M. cynos* -bakteerilla. Histopatologisessa tutkimuksessa bakteerien todettiin aiheuttaneen hyvin voimakkaita vaurioita keuhkoputkissa ja keuhkokudoksessa. Epiteelisolut olivat turvonneita ja niissä näkyi vakuolisaatiota. Lisäksi värekarvat olivat vaurioituneita ja niiden määrä oli vähentynyt (Rosendal ja Vinther 1977). Myös vuonna 1978 Rosendal teki kokeellisen tutkimuksen, jossa tutkittiin *M. cynosin* aiheuttamaa pneumoniam koiranpennuilla. Tutkimusotos oli neljä kolmen kuukauden ikäistä koiraa, jotka olivat tulleet kennelistä, jossa oli juuri ollut koiran penikkatautivirus (canine distemper virus, CDV) -tartuntapurkaus. Myös tässä tutkimuksessa koirien alahengitystiet infektoitiin, tällä kertaa useilla eri mycoplasmalajeilla. Mycoplasmoista *M. cynos* aiheutti koirille pneumonian ja histologisessa tutkimuksessa löytyi vakavia tulehdusmuutoksia keuhkoputkista ja niitä ympäröivistä kudoksista. Tutkimuksessa ei kuitenkaan voitu poissulkea mahdollisuutta, että koiran penikkatautiviruksella tai *Pseudomonas*-suvun bakteereilla ei olisi ollut osuutta voimakkaisiin muutoksiin (Rosendal 1978).

Lisää todisteita todennäköisestä mycoplasmojen osuudesta vakaviin hengitystieinfektioihin saatiin vuonna 2007, kun Zeugswetter ym. kuvasivat potilastapauksen, jossa kultaisen noutajanpentuja menehtyi *M. cynosin* aiheuttamaan bronkopneumoniaan. Pentueeseen syntyi 11 pentua, joista neljällä oli huomattavasti muita alhaisempi syntymäpaino. Nämä neljä pienintä pentua menehtyivät kahden ensimmäisen elinviikon aikana. Pennuille ei tehty raadonavausta, mutta muut jäljellä olevat pennut, emä ja kasvattajan kahdeksan muuta koiraa tarkastettiin eläinlääkärillä. Yhdeltäkään koiralta ei löytynyt sairauden merkkejä. Kolmen viikon ikäisinä kaikki jäljellä olleet seitsemän pentua saivat hengitystieoireita (voimakas purulentti nenävuoto sekä yskä) ja niille nousi korkea kuume. Pennut testattiin adenovirusten (CAV-1 ja CAV-2) sekä penikkatautiviruksen (CDV) varalta. Tulokset olivat negatiivisia. Pennuille aloitettiin amoksisilliini-antibiootti, mutta kolme pentua menehtyi siitä

huolimatta. Kuolleille pennuille tehtiin raadonavaus, joissa paljastui hyvin voimakas akuutti yleistynyt katarraalis-suppuratiivinen, osittain hemorragis-fibrinoottinen nekrotisoiva bronkopneumonia ja lievä keuhkokalvontulehdus. Immunohistokemiallinen tutkimus viittasi mahdolliseen *M. cynos*-infektioon. Epäilyä oli myös CHV, mutta sitä pidettiin raadonavaustulosten perusteella epätodennäköisenä, koska histopatologisessa tutkimuksessa ei löydetty kyseistä virusta. Keuhkokudoksesta tehtiin myös bakteeriviljely, josta löytyi ainoana bakteerina *M. cynos*. Jäljelle jääneille pennuilla vaihdettiin erytromysiini-antibiootti, koska amoksisilliini ei tehoa mycoplasmoihin. Pennut paranivat tällä hoidolla. Pentujen tutkimuksen ohessa myös emästä otettiin näytteitä nielusta, nenästä, maidosta ja vaginasta. Bakteeriviljelyissä nielusta löytyi *M. cynosta* ja *M. canista*, muut näytteet olivat negatiivisia mycoplasmojen osalta. Zeugswetter ym. (2007) epäilivätkin, että pennut ovat voineet saada *M. cynos*-infektion emältään. Pennuilta löytyi myös voimakas suolinkaisinfektio mahalaukusta ja ohutsuolesta. Tutkimuksessa ei voitu täysin poissulkea mahdollisuutta, että suolinkaisten larva-asteen kehitysmuodot eivät olisi vaeltaneet keuhkojen kautta, vaurioittaneet keuhkokudosta ja siten pahentaneet pentujen keuhkomuutoksia (Zeugswetter ym. 2007). Toisaalta tutkimuksessa ei myöskään poissuljettu mahdollista CPIV-infektiota, joka voi pennuilla ja immuunivajavaisilla aiheuttaa melko vakaviakin oireita, erityisesti yhdistettynä muihin patogeeneihin (Buonavoglia ja Martella 2007).

Chvala ym. (2007) puolestaan kuvasivat tapauksen, jossa viiden kuukauden ikäinen kääpiöpinserinarttu sairastui voimakkaisiin hengitystieoireisiin. Pennulla oli korostuneet hengitysäänet, yli 40 °C kuumetta ja voimakas, erityisesti innostuessa voimistuva dyspnea, jonka seurauksena koira alkoi hengittää suu auki. Yrityksistä huolimatta koiranpentu ei vastannut hoitoon ja se lopetettiin. Raadonavauksessa näkyi keuhkoissa voimakas diffuusi akuutti fibrinoottinen pneumonia ja multifokaalisia hemorragisia sekä nekroottisia alueita. Mikrobiologisissa tutkimuksissa löytyi taudinaiheuttajina CDV, CAV ja *M. cynos*. Tutkimusryhmä epäili, että vakavat, nekrotisoivat löydökset voisivat mahdollisesti olla *M. cynosin* aiheuttamia, sillä myös Zeugswetterin ym. (2007) kuvaamassa tapauksessa keuhkoista löytyi nekroottisia alueita (Chvala ym. 2007).

Vuonna 2015 Pinkos ym. havaitsivat ensimmäistä kertaa tapauksen, jossa *M. cynos-*bakteerin aiheuttamaan pneumoniaan sairastuneella 11 kuukauden ikäisellä rhodesiankoiralla esiintyi punasolujen agglutinaatiota + 4 °C lämpötilassa (nk. kylmäagglutinaatio), mutta ei huoneen- (+21 °C) tai ruumiinlämmössä (+ 37 °C). Agglutinaatiota tapahtui kuitenkin vain siinä määrin, että potilaalle ei kehittynyt anemiasia. Kylmäagglutinaatiota on tutkimusryhmän mukaan kuvattu useasti ihmisillä *Mycoplasma*-infektioiden yhteydessä, mutta ei koskaan aiemmin koiralla. Koira sai 8 viikon enrofloksasiinikuurin *Mycoplasma*-infektioon, jonka avulla potilas parani pneumoniasta. Myöskään agglutinaatiota ei enää havaittu paranemisen jälkeen. Tutkimusryhmä pohti myös, että havainto on merkityksellinen, koska kliinisessä työssä eläinlääkäri voisi autoagglutinaatiota havaitessaan aloittaa potilaalle immunosuppressiivisen lääkityksen, mikä taas bakteriellistä pneumoniasta kärsivän potilaan kohdalla ei ole hyvä vaihtoehto (Pinkos ym. 2015).

2.5 *Mycoplasma*-infektioiden hoito

Koska mycoplasmoilla ei ole lainkaan soluseinää (Bemis 1992, Razin ja Tully 1995, Quinn ym. 2011), ne ovat luontaisesti resistenttejä antibiooteille, joiden toimintamekanismi perustuu bakteerin soluseinäsynteesin vaurioittamiseen (Quinn ym. 2011). Tästä syystä esimerkiksi beetalaktaami-antibiooteilla ei ole vaikutusta mycoplasmoihin (Bemis 1992), vaan niihin tehoaa esimerkiksi doksisykliini, enrofloksasiini, marbofloksasiini, pradofloksasiini, asitromysiini ja minosykliini (Lappin ym. 2017).

Jamesonin ym. (1995) tekemässä tutkimuksessa potilaiden hoitovaste ei kuitenkaan riippunut siitä, oliko bakteriellin pneumonian hoidossa käytetty antibiootteja, joilla on tehoa mycoplasmoihin, vai ei, vaikka potilailta eristettiin *Mycoplasma*-suvun bakteereita (Jameson ym. 1995). Myöskään Tartin ym. (2010) aspiraatiopneumoniapotilaiden kohdalla ei löytynyt tilastollisesti merkitsevää yhteyttä antibioottivalinnan ja potilaiden selviytymisen välillä (Tart ym. 2010). Mutta

Zeugswetterin ym. (2007) kuvaamassa potilastapauksessa koiranpennut taas paranivat, kun beetalaktaameihin kuuluva amoksisilliini-antibiootti vaihdettiin erytromysiiniin (Zeugswetter ym. 2007). Samoin Pinkosin ym. (2015) kuvaama *Mycoplasma*-pneumoniaan sairastunut nuori koira parani enrofloksasiini-kuurin avulla (Pinkos ym. 2015). Syynä näihin havaintoihin voi olla myös se, että Jamesonin ym. (1995) ja Tartin ym. (2010) potilaista suurimmalla osalla oli kyseessä sekainfektio, jolloin myös muilla bakteereilla on ollut suuri merkitys taudinaiheutuksessa, kun taas kahden muun tutkimusryhmän potilaista *M. cynosta* pidettiin pääasiallisena taudinaiheuttajana.

3 POHDINTA

Mycoplasmojen on todettu olevan osa ylähengitysteiden normaaliflooraa, mutta alahengitysteiden osalta on saatu ristiriitaisia tuloksia mycoplasmojen esiintyvyydestä terveillä koirilla. Osassa tutkimuksista alahengitystienäytteistä tehdyissä mycoplasmaviljelyissä ei ole lainkaan löydetty mycoplasmoja (Rodendal 1973), osassa niitä on löydetty jopa 27 %:lla koirista (Randolph ym. 1993). On kuitenkin huomioitava se, että kaikissa prevalenssitutkimuksissa ei tehdä spesifisiä mycoplasmaviljelyitä. Tällöin mycoplasmojen osuus tuloksissa jää todellista pienemmäksi, koska mycoplasmat vaativat kasvaakseen erityiset viljelyolosuhteet, eikä niitä saada välttämättä eristettyä tavallisissa bakteeriviljelyissä. Laajoissa terveiden koirien hengitystienäytteiden mikrobiprevalenssitutkimuksissa voi olla hyödyllistä mycoplasmaviljelyiden haasteellisuuden vuoksi tehdä PCR-tutkimuksia, jos ei ole tarkoitus pohtia mikrobien kliinistä merkitystä.

Sairaiden koirien kohdalla tavallisten PCR-tulosten tulkinta puolestaan on haasteellista, koska tällöin on nimenomaan pohdittava mikrobilöydösten merkitystä taudinaiheutuksessa. PCR-tutkimuksissa näytteestä voi löytyä myös kuolleiden tai yksittäisten mikrobien DNA:ta, joilla ei ole ollut taudinaiheutuksen kannalta merkitystä, vaikka DNA olisikin peräisin jostain patogeenisestä mikrobista. Tällöin tulosta voidaan tulkita virheellisesti. PCR-tutkimuksista kliinistä merkitystä voisi olla mahdollista tulkita kvantitatiivisella real-time-PCR:llä, josta käy ilmi tutkittavassa näytteessä olleiden mikrobien määrät suhteessa toisiin mikrobeihin. Näin ollen mikrobimääriä vertailemalla voidaan paremmin arvioida kyseisten bakteerien osuutta taudinaiheutuksessa.

Toisaalta mycoplasmojen merkittävyyttä taudinaiheutuksessa pohtiessa on myös huomioitava, että mycoplasmojen esiintyvyyksiin vaikuttaa tutkimusmenetelmän lisäksi näytteenottotapa. Koska mycoplasmat ovat ylähengitysteiden normaaliflooraa, sieltä otetuissa näytteissä kliinistä merkitystä sairailta koirilla voi olla hankalaa arvioida.

Mahdollisesti tavallista PCR:ää luotettavampi tutkimusmenetelmä mycoplasmojen diagnosoinnille kliinisestä näkökulmasta on bakteeriviljely. Viljelyn ongelmana kuitenkin on se, että viljelytuloksen saaminen kestää noin kaksi viikkoa. Yksittäisen hengitystieoireilevan koiran kohdalla ei voida odottaa tuloksia niin kauan, vaan potilaan hoito on aloitettava aiemmin. Tämä luo oman haasteensa erityisesti nykyisessä mikrobilääkeresistenssitilanteessa, jossa mikrobilääkkeen valinta tulisi aina tehdä bakteeriviljelyn ja herkkyysmäärityksen perusteella. Varsinkin, kun mycoplasmoihin tehoavat mikrobilääkkeet eivät kuulu ensisijaisiin mikrobilääkevalintoihin muiden hengitystiebakteerien hoidossa.

Tutkimustuloksia mycoplasmojen esiintyvyydestä koirien hengitystiesairauksien yhteydessä on melko rajallisesti, joten mycoplasmojen merkitys koirien hengitystiesairauksissa on edelleen hieman epäselvä. Näyttöä on mycoplasmojen kyvystä toimia primaarina taudinaiheuttajana erityisesti nuorilla koirilla, mutta useammin se liitetään sekainfektioihin sekundaarisena taudinaiheuttajana.

Mycoplasmojen merkityksestä hengitystiesairauksiin on ehkä tutkittu eniten kenneluskäen yhteydessä. Ainoa mycoplasmalaji, jolla on tutkimuksessa todettu tilastollisesti merkitsevä kenneluskäen, on ollut *M. cynos* (Chalker ym. 2004). Mycoplasmojen esiintyvyys kenneluskäessä vaihtelee valtavasti: muutamasta prosentista jopa 80 % tietämille (Decaro ym. 2016, Joffe ym. 2016). Toisaalta molempien tutkimusryhmien näytteet olivat otettu ylähengitysteistä, missä mycoplasmojen tiedetään kuuluvan normaaliflooraan. Decaron ym. (2016) tutkimustulosten perusteella kuitenkin oireilu on ollut voimakkaampaa, kun taudinaiheutukseen on liittynyt mycoplasmoja kuin mikäli mycoplasmoja ei ole ollut (Decaro ym. 2016). Chalkerin ym. (2004) tutkimuksessa puolestaan *M. cynos* liitettiin useammin keskiverto-oireileviin kuin lieviin tai hyvin voimakasoireisiin. Toisaalta tutkimusryhmä pohti myös sitä, että mitä vakavammat oireet, sitä useampi eri mikrobi näytteissä on ollut, jolloin mycoplasmojen eristäminen bakteeriviljelyistä on ollut vaikeampaa ja siksi mahdollisesti tullut virhenegatiivisia *Mycoplasma*-viljelyitä voimakasoireisilla koirilla (Chalker ym. 2004). Voimakkaat oireet kenneluskäessä

liittynevät siis ainakin suurempaan mikrobimäärään, mutta myös mycoplasmoilla lieenee osuutta oireiden pahenemisessa.

Vähiten mycoplasmojen osuutta on tutkittu kroonisten hengitystiesairauksien kohdalla ja tutkimuksia on hyvin niukasti. On kuitenkin epäilty mycoplasmoilla olevan yhteyttä kroonisiin hengitystiesairauksiin ja sitä kautta hengitysteiden kollapseihin (Chandler ja Lappin 2002), mutta vähäisen tutkimustiedon perusteella aukottomia johtopäätöksiä ei voitane kuitenkaan tehdä. Vaikka on todettu, että hengitysteiden bakteeritulehduksilla on yhteyttä hengitysteiden kollapseihin, mycoplasmojen osuudesta taudinaiheutuksessa tarvittaisiin lisää tutkimusta. Erityisesti koska usein puhutaan mycoplasmojen yhteydestä ihmisten pitkittyneisiin hengitystieoireisiin, olisi tarpeellista selvittää onko mycoplasmoilla osuutta myös koirien kroonisissa hengitystiesairauksissa.

Tutkimuksissa on kiinnitetty myös huomiota sairastuneiden koirien ikään ja mycoplasmat vaikuttavat olevan yleisempiä nuorilla, alle 1-vuotiailla koirilla, erityisesti hengitystieinfektioiden yhteydessä (Randolph ym. 1993, Chalker ym. 2004, Johnson ym. 2013). Lisäksi nuorten koirien kohdalla osa *Mycoplasma*-infektioista on ollut hyvinkin vakavia, jopa kuolemaan johtavia. Erityisesti Zeugswetterin ym. (2007) kuvaama tapaus kultaisen noutajanpennuista sai ajattelemaan, että eläinlääkäreiden olisi syytä pohtia näytteenottoa tai ylipäättään mycoplasmojen mahdollisuutta erityisesti tilanteissa, joissa nuorilla koirilla on vakavia hengitystieoireita tai potilaan tilanne ei parane käytössä olevalla hoidolla, erityisesti, jos on käytetty beetalaktaami-antibiootteja. Vaikkakin tosiaan nykyisessä mikrobilääkeresistenssitilanteessa tulisi aina ottaa näyte ja tehdä herkkyysmääritykset ennen mikrobilääkkeiden aloittamista, ei potilaan hoito voi odottaa mycoplasma viljelyiden valmistumista. Tällöin on mietittävä mikrobilääkkeen vaihtoa tai mycoplasmoihin tehoavan mikrobilääkkeen aloittamista ilman viljelytulosta. Toisaalta nopeampia, ainakin suuntaa-antavia, tuloksia saataisiin käyttämällä kvantitatiivista real-time-PCR:ää (qPCR). qPCR:n tuloksista voisi saada viitteitä taudinaiheuttajasta ja tukea mikrobilääkkeen vaihdolle, mikäli näytteestä löytyisi suuria määriä mycoplasmoja. qPCR:n hyödyllisyydestä *Mycoplasma*-

diagnostiikassa verrattuna mycoplasmaviljelyihin ei kuitenkaan ole olemassa tällä hetkellä tutkimustietoa.

Toisaalta vaikka mycoplasmaviljelyn tulos ei anna sillä hetkellä tietoa yksittäisen potilaan hoitoon, voi siitä kuitenkin saada arvokasta tietoa populaatiotasolla esimerkiksi kenneleissä tai löytöeläinkodeissa. Rycroftin ym. (2006) tutkimuksessa todettiin, että 62 % koirista sairastui hengitystieoireisiin kolmen viikon sisällä löytöeläinkotiin saapumisesta ja näistä koirista 46 % oli seropositiivisia *M. cynosille* (Rycroft ym. 2006), joten mycoplasmat leviävät tiiviissä koirapopulaatiossa herkästi. Tutkimuksissa kun on myös löydetty *M. cynosia* kennelin sisäilmasta (Chalker ym. 2004) ja viitteitä mycoplasmojen kyvystä selviytyä ympäristössä jopa kuukausia (Mannering ym. 2009). Tieto koiran sairastumisesta mycoplasmaan voi olla arvokas kennelin pitäjälle, erityisesti jos sairastumisia on useita tai, jos kennelissä on nuoria koiria tai pieniä pentuja. Tällöin voidaan pohtia lääkitystarvetta arvioidessa myös mycoplasmojen mahdollisuutta, jotta välttyttäisiin tilanteilta, joissa pienet pennut saavat vakavia mycoplasmojen aiheuttamia hengitystieinfektioita ja pahimmillaan jopa menehtyvät niihin.

LÄHDELUETTELO

- Angus JC, Jang SS, Hirsh DC. Microbiological study of transtracheal aspirates from dogs with suspected lower respiratory tract disease: 264 cases (1989-1995). J Am Vet Med Assoc 1997, 210:55-58.
- Armstrong D, Morton V, Yu B, Friedman MH, Steger L, Tulli JG. Canine Pneumonia Associated with Mycoplasma Infection. Am J Vet Res 1972, 33:1471-1478.
- Aspinall V, Cappello M, Phillips C. Introduction to Veterinary Anatomy and Physiology textbook. 3. p. Elsevier. 2015.
- Bemis DA. Bordetella and Mycoplasma respiratory infections in dogs and cats. Vet Clin North Am Small Anim Pract 1992, 22:1173-1186.
- Buonavoglia C, Martella V. Canine respiratory viruses. Vet Res 2007, 38:355-373.
- Chalker VJ. Canine mycoplasmas. Res Vet Sci 2005, 79:1-8.
- Chalker VJ, Owen WMA, Paterson C, Barker E, Brooks H, Rycroft AN, Brownlie J. Mycoplasmas associated with canine infectious respiratory disease. Microbiology 2004, 150:3491-3497.
- Chan CM, Ridgway MD, Mitchell MA, Maddox CW. Association between *Mycoplasma*-specific polymerase chain reaction assay results and oral bacterial contamination of bronchoalveolar lavage fluid samples from dogs with respiratory tract disease: 121 cases (2005-2012). J Am Vet Med Assoc 2013, 243:1573-1579.
- Chandler JC, Lappin MR. Mycoplasmal Respiratory Infections in Small Animals: 17 cases (1988-1999). J Am Anim Hosp Assoc 2002, 38:111-119.
- Chvala S, Benetka V, Möstl K, Zeugswetter F, Spargser J, Weissenböck H. Simultaneous Canine Distemper Virus, Canine Adenovirus Type 2, and Mycoplasma Cynos Infection in a Dog with Pneumonia. Vet Pathol 2007, 44:508-512.
- Creevy KE. Airway evaluation and flexible endoscopic procedures in dogs and cats: laryngoscopy, transtracheal wash, tracheobronchoscopy, and bronchoalveolar lavage. Vet Clin Small Anim 2009, 39:869-880.

Decaro N, Mari V, Larocca V, Losurdo M, Lanave G, Lucente MS, Corrente M, Catella C, Bo S, Elia G, Torre G, Grandolfo E, Martella V, Buonavoglia C. Molecular surveillance of traditional and emerging pathogens associated with canine infectious respiratory disease. *Vet Microbiol* 2016, 192:21-25.

Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG. *Textbook of Veterinary Anatomy*. 4. p. Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, Yhdysvallat 2010.

Ericsson AC, Personett AR, Grobman ME, Rindt H, Reinero CR. Composition and Predicated Metabolic Capacity of Upper and Lower Airway Microbiota of Healthy Dogs in Relation to the Fecal Microbiota. *PLoS ONE* 2016, 11: e0154646. doi: 10.1371/journal.pone.01154646

Erles K, Dubovi EJ, Brooks HW, Brownlie J. Longitudinal Study of Viruses Associated with Canine Infectious Respiratory Disease. *J Clin Microbiol* 2004, 42:4524-4529.

Finke MD. Transtracheal Wash and Bronchoalveolar Lavage. *Top Companion Anim Med* 2013, 28:97-102.

Hanel RM, Hansen B. Pneumonia. Teoksessa: Bonagura JD, Twedt DC. *Kirk's Current Veterinary Therapy XV*. Elsevier, St. Louis, Missouri, Yhdysvallat 2014. 681-688.

Hawkins EC. Respiratory System Disorders. Teoksessa: Nelson RW, Couto CG. *Small Animal Internal Medicine*. 5. p. Elsevier, St. Louis, Missouri, Yhdysvallat 2009. 217-366.

Hawkins EC, Rogala AR, Large EE, Bradley JM, Grindem CB. Cellular composition of bronchial brushing obtained from healthy dogs and dogs with chronic cough and cytologic composition of bronchoalveolar lavage fluid obtained from dogs with chronic cough. *Am J Vet Res* 2006, 67:160-167.

Jameson PH, King LA, Lappin MR, Jones RL. Comparison of clinical signs, diagnostic findings, organisms isolated, and clinical outcome in dogs with bacterial pneumonia: 93 cases (1986-1991). *J Am Vet Med Assoc* 1995, 206:206-209.

Joffe DJ, Lelewiski R, Weese JS, McGill-Worseley J, Shankel C, Mendonca S, Sager T, Smith M, Poljak Z. Factors associated with development of Canine Infectious Respiratory Disease Complex (CIRDC) in dogs in 5 Canadian small animal clinics. *Can Vet J* 2016, 57:46-51.

Johnson LR, Queen EV, Vernau W, Sykes JE, Byrne BA. Microbiologic and Cytologic Assessment of Bronchoalveolar Lavage Fluid from Dogs with Lower Respiratory Tract Infection: 105 cases (2001-2011). J Vet Intern Med 2013, 27:259-267.

Lavan R, Knesl O. Prevalence of canine infectious respiratory pathogens in asymptomatic dogs presented at US animal shelters. J Small Anim Pract 2015, 56:572-576.

Lappin MR, Blondeau J, Boothe D, Breitschwerdt EB, Guardabassi L, Lloyd DH, Papich MG, Rankin SC, Sykes JE, Turnidge J, Weese JS. Antimicrobial use Guidelines for Treatment of Respiratory Tract Disease in Dogs and Cats: Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases. J Vet Intern Med 2017, 31:279-294.

Lindsey JO, Pierce AK. An Examination of the Microbiologic Flora of Normal Lung of the Dog. Am Rev Respir Dis 1978, 117:501-505.

MacLachlan NJ, Dubovi EJ. Fenner's Veterinary Virology. 4 p. Academic Press, San Diego, California, Yhdysvallat 2011.

Mannering SA, McAuliffe L, Lawes JR, Erles K, Brownlie J. Strain typing of *Mycoplasma cynos* isolates from dogs with respiratory disease. Vet Microbiol 2009, 135:292-296.

McKiernan BC, Smith AR, Kissil M. Bacterial Isolates From the Lower Trachea of Clinically Healthy Dogs. J Am Anim Hosp Assoc 1982, 20:139-142.

Melamies MA, Järvinen A-K, Seppälä KM, Rita JK, Rajamäki MM. Comparison of results for weight-adjusted and fixed-amount bronchoalveolar lavage techniques in healthy Beagles. Am J Vet Res 2011, 72:694-698.

Pecora DV. Bacteriologic Cultural Examination of the Lower Respiratory Tract of Laboratory Dogs. Am J Vet Res 1976, 37:1511-1513.

Pinkos AC, Friedrichs KR, Monaghan KN, Sample SH, Trepanier LA. Transient cold agglutinins associated with *Mycoplasma cynos* pneumonia in dogs. Vet Clin Pathol 2015, 44:498-502.

Priestnall SL, Mitchell JA, Walker CA, Erles K, Brownlie J. New and Emerging Pathogens in Canine Infectious Respiratory Disease. Vet Pathol 2014, 51:492-504.

Quinn PJ, Markley BK, Leonard FC, FitzPatrick ES, Fanning S, Hartigan PJ. Veterinary Microbiology and Microbial Disease. 2. p. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, Yhdysvallat 2011.

Randolph JF, Moise NS, Scarlett JM, Shin SJ, Blue JT, Bookbinder PR. Prevalence of mycoplasmal and ureaplasma recovery from tracheobronchial lavages and prevalence of mycoplasmal recovery from pharyngeal swab specimens in dogs with or without pulmonary disease. Am J Vet Res 1993, 54:387-391.

Razin S, Tully JG. Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology vol I: Molecular Characterization. Academic Press, San Diego, California, Yhdysvallat 1995.

Rosendal S. Mycoplasmas as a possible cause of enzootic pneumonia in dogs. Acta Vet Scand 1972, 13:137-139.

Rosendal S. Canine Mycoplasmas I: Cultivation from conjunctivae, respiratory- and genital tracts. Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol 1973, 81:441-445.

Rosendal S. Canine Mycoplasmas: Pathogenicity of Mycoplasmas Associated With Distemper Pneumonia. J Infect Dis 1978, 138:203-210.

Rosendal S. Canine mycoplasmas: Their ecologic niche and role in diseases. J Am Vet Med Assoc 1982, 180:1212-1214.

Rosendal S, Vinther O. Experimental mycoplasmal pneumonia in dogs: electron microscopy of infected tissue. Acta Pathol Microbiol Scand B 1977, 85:462-465.

Rycroft AN, Tsounakou E, Chalker V. Serological evidence of Mycoplasma cynos infection in canine infectious respiratory disease. Vet Microbiol 2007, 120:358-362.

Schultz BS, Kurz S, Weber K, Balzer H-J, Hartmann K. Detection of respiratory viruses and *Bordetella bronchiseptica* in dogs with acute respiratory tract infections. Vet J 2014, 201:365-369.

Tart KM, Babski DM, Lee JA. Potential risks, prognostic indicators, and diagnostic and treatment modalities affecting survival in dogs with presumptive aspiration pneumonia: 125 cases (2005-2008). J Vet Emerg Crit Care 2010, 20:319-329.

Tress B, Dorn ES, Suchodolski JS, Nisar T, Ravindarn P, Weber K, Hartmann K, Schultz BS. Bacterial microbiome of the nose of healthy dogs and dogs with nasal disease. PLoS ONE 2017, 12: e0176736. doi: 10.1371/journal.pone.0176736

Viitanen SJ, Lappalainen A, Rajamäki MM. Co-infections with Respiratory Viruses in Dogs with Bacterial Pneumonia. J Vet Intern Med 2015, 29:544-551.

Williams M, Olver C, Thrall MA. Transtracheal wash from a puppy with respiratory disease. Vet Clin Pathol 2006, 35:471-473.

Windsor RC, Johnson LR, Sykes JE, Drazenovich TL, Leutenegger CM, De Cock HEV. Molecular Detection of Microbes in Nasal Tissue of Dogs with Idiopathic Lymphoplasmacytic Rhinitis. J Vet Intern Med 2006, 20:250-256.

Zeugswetter F, Weissenböck H, Shibly S, Hassan J, Spargser J. Lethal bronchopneumonia caused by *Mycoplasma cynos* in a litter of golden retriever puppies. Vet Rec 2007, 161:626-627.

Zhu BY, Johnson LR, Vernau W. Tracheobronchial Brush Cytology and Bronchoalveolar Lavage in Dogs and Cats with Chronic Cough: 45 Cases (2012-2014). J Vet Intern Med 2015, 29:526-532